

## ВОЗМОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

И.С. Леонова, В.И. Падалко

НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, Украина

### РЕЗЮМЕ

Установлено, что фенобарбитал, существенно не влияя на морфологию, смертность и интенсивность дыхания клеток культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, стимулирует накопление эргостерина в клетках культуры, изменяя тем самым их стресс-устойчивость. Этот факт может свидетельствовать о том, что продолжительное использование лекарственных средств, содержащих фенобарбитал, на фоне терапии кандидозов и микозов может оказывать влияние на эффективность применяемых при этом препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** дрожжи, эргостерин, фенобарбитал

Как известно, экзогенные факторы, в том числе и лекарственные препараты, способны оказывать существенное влияние на интенсивность метаболизма микроорганизмов, а значит, и модифицировать течение патологических процессов, инициируемых микроорганизмами (в частности, дрожжами рода *Candida*) [1].

На сегодня одним из наиболее успешных подходов к лечению кандидозов и микозов является применение группы препаратов, действующих на стеринный обмен возбудителей данных заболеваний [2-5]. Основным механизмом действия этой группы препаратов заключается в ингибировании синтеза стерина у микроорганизмов на уровне цитохром Р-450 – зависимого 14- $\alpha$ -деметилирования

ланостерола [6, 7]. Подтверждением участия цитохрома Р-450 в 14- $\alpha$ -деметилировании ланостерола может служить тот факт, что кислород и NADPH-зависимое превращение ланостерола в 4,4-диметилзимосерин ингибируется антителами к цитохрому Р-450 [8].

Известно, что классическим индуктором цитохромов Р-450 является фенобарбитал [9], входящий в состав целого ряда лекарственных препаратов, применяемых в качестве успокоительных, снотворных и противосудорожных средств.

Учитывая вышеизложенное, в работе было изучено влияние фенобарбитала на интенсивность метаболических процессов клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, родственных патогенным дрожжам рода *Candida*.

Содержание эргостерина определяли спектрофотометрически в области длин волн 200-310 нм [14] на спектрофотометре Specord UV VIS «Carl Zeiss Jena» (Германия) по методу [14] во всех экспериментальных вариантах на 10 и 14-е сутки роста культуры. Содержание эргостерина рассчитывали по максимуму поглощения при 281 нм, используя коэффициент молярной экстинкции 11500 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [13, 14].

Для изучения устойчивости клеток дрожжей к осмотическому шоку в культуру дрожжей вносили NaCl до конечной концентрации 1,3 М [15].

Для изучения устойчивости клеток дрожжей к тепловому шоку культуру дрожжей помещали в пробирки и погружали в водный термостат с температурой 45°C [16]. Экспозиция составляла 30 и 60 минут [17].

В качестве показателя интенсивности метаболической активности культуры использовали эндогенное дыхание клеток дрожжей [18], которое определяли

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил дикий штамм пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученный из коллекции ОАО Пив-завод «Рогань» (г. Харьков). Культура росла на среде следующего состава: глюкоза – 0,5%, сусло – 25%. Дрожжи культивировали в колбах объемом 250 мл при температуре 25°C и постоянном перемешивании [10, 11]. Объем среды составлял 50 мл. Для эксперимента биомассу отбирали на указанные в тексте сутки роста культуры. Фенобарбитал вносили в среду культивирования дрожжей в концентрации 0,01 мг/мл.

Количество клеток дрожжей подсчитывали общепринятым методом в камере Горяева. Соотношение «живых» и «мертвых» клеток определяли при помощи красителя трипанового синего (0,8%) [12].

Экстракцию стерина из клеток дрожжей проводили по методу Бревика и Оводса в модификации Вудса [13].

полярнографически по скорости потребления кислорода при помощи кислородного электрода Кларка [19].

Содержание белка определяли по методу Лоури и соавторов в модификации Миллера [20].

Сравнение средних величин в выборках с нормальным распределением проводили при помощи t-критерия Стьюдента с использованием компьютерного пакета программ «Statistika V.6». Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В клетках *S. cerevisiae* стерины преимущественно локализованы в митохондриях и микросомах, с которыми связаны ферментные системы, участвующие в биосинтезе эргостерина [21]. Кроме того, небольшая часть стеринов содержится во внутриклеточных мембранах [22]. Основное значение стеринов и, в частности, эргостерина, на долю которого приходится до 80% всех стеринов клетки, связывают с ролью структурного компонента мембран [23]. Такие свойства клеточной мембраны, как текучесть [24], проницаемость [25, 26], устойчивость к лизису, эндоцитоз [27, 28], вязкость [25, 27] связаны с наличием в ней стеринов. Для поддержания дыхательной активности дрожжи предпочитают эргостерин другим стеринам [29]. Стерины принимают участие в транспорте ненасыщенных жирных кислот и поддержании равновесия между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами в клетке дрожжей [30, 31]. Существует предположение, что образование эргостерина – ни что иное, как реакция детоксикации, защищающая

микроорганизмы от излишнего количества жирных кислот [32]. Кроме того, благодаря способности к комплексообразованию стерины являются защитным фактором от токсического действия многих природных соединений и внешних воздействий [23, 30].

Имеются данные также о том, что стерины в мембранах влияют на функцию пермеазных систем клетки, определяя тем самым проницаемость мембраны для различных соединений [33].

Большое внимание исследователей привлекает и такая функция стеринов, как регуляция роста клеток дрожжей [30].

Вышеприведенные данные свидетельствуют о значительной роли эргостерина в процессах жизнедеятельности дрожжей *S. cerevisiae*, поэтому изучение влияния лекарственных средств на синтез эргостерина в клетках дрожжей может представлять существенный интерес для медицины и фармакологии.

При изучении влияния фенобарбитала на накопление эргостерина установлено, что его содержание в клетках дрожжей при внесении фенобарбитала в среду культивирования значительно увеличивалось и превышало контроль в 1,8-2,5 раз с 7 по 16 сутки культивирования (рис. 1).

Для целей данной работы представляло интерес сравнение двух культур дрожжей *S. cerevisiae*, клетки которых накапливали разное количество эргостерина. Содержание эргостерина в первой было 16,0-17,0 нмоль на  $10^7$  клеток (культура К 1), а во второй 22,0-23,0 нмоль на  $10^7$  клеток (культура К 2).

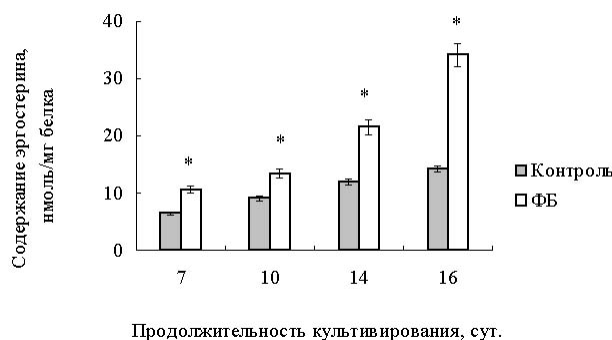


Рис. 1. Содержание эргостерина в клетках *Saccharomyces cerevisiae* при росте на среде, содержащей фенобарбитал, на различных этапах культивирования.

Инкубация клеток дрожжей в условиях теплового шока показала, что в культуре К 2 количество мертвых клеток было в 1,8 и 2 раза больше (через 30 и 60 минут

культивирования), чем в культуре К 1 (рис. 2).

В случае осмотического шока через 30 и 60 минут инкубации в культуре К 2,

количество мертвых клеток было в 1,7 и 1,6 раза больше, чем в культуре К 1 (рис. 3).

Таким образом, культура дрожжей, содержание эргостерина в клетках которой было выше (К 1), была более устойчива к действию таких стрессорных факторов,

как осмотический и температурный шок. Исходя из этих данных, можно предположить, что фенobarбитал, индуцируя накопление эргостерина в клетках дрожжей, может опосредованно приводить к повышению устойчивости культуры к воздействию стресс-факторов

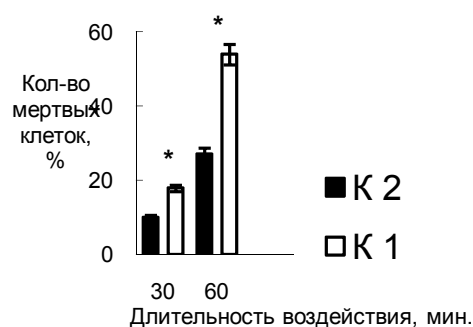


Рис. 2. Количество мертвых клеток в культуре *S. cerevisiae* с разным накоплением эргостерина после теплового шока

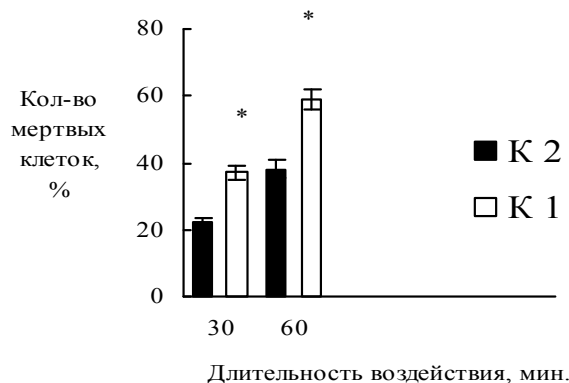


Рис. 3. Количество мертвых клеток в культуре *S. cerevisiae* с разным накоплением эргостерина после осмотического шока

Исследование динамики роста популяции клеток в присутствии фенobarбитала в среде культивирования дрожжей показало снижение интенсивности роста культуры на 23% и 29% к 7 и 10 суткам соответственно.

Существенного различия в динамике накопления мертвых клеток в контроле и опыте не наблюдалось (рис. 4). Нами не было обнаружено и существенных морфологических изменений клеток дрожжей в условиях эксперимента (рис. 5)

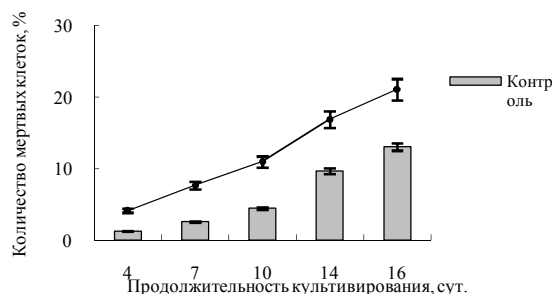
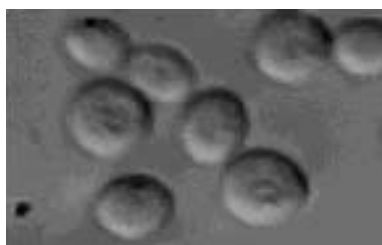
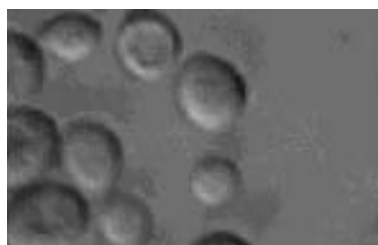


Рис. 4. Количество мертвых клеток в культуре *Saccharomyces cerevisiae* при росте на среде, содержащей фенobarбитал, на различных этапах культивирования



Контроль



Фенobarбитал

Рис. 5. Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, культивируемые на среде с фенobarбиталом (ФБ) (увеличение в 600 раз)

Измерения интенсивности потребления кислорода в культуре дрожжей на 7, 10, 14 и 16 сутки роста культуры не показали достоверных различий. Интенсивность потребления кислорода в культуре, растущей на среде с фенобарбиталом, оставалась на уровне контроля.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, на основании полученных нами данных можно полагать, что фенобарбитал в исследованной концентрации, существенно не влияя на

морфологию, смертность и интенсивность дыхания клеток культуры дрожжей, может стимулировать накопление эргостерина в клетках, изменяя тем самым их стресс-устойчивость. Этот факт может свидетельствовать о том, что продолжительное использование препаратов, содержащих фенобарбитал, на фоне терапии кандидозов и микозов может оказывать определенное влияние на ход лечения этих заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Henry K.W., Nickels J.T., Edlind T.D. // *Antimicrob. Agents & Chemother.* - 2000. - Vol. 44. - P. 2693-2700.
2. Mercer E.I. // *Lipids.* - 1991. - Vol. 26. - P. 584-597.
3. Ma D. // *Progress in Drug Research.* - 2001. - Vol. 57. - P. 45.
4. Hasenoehrl A. // 41<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 16-19 Dec. 2002, Chicago, IL, USA.—Abstract 2143.
5. Dorrell S. // *Drug Discovery Today.* - 2002. - Vol. 7. - № 6. - P.332-333.
6. Turi T.G., Loper J.C. // *J. Biol. Chem.* - 1992. - Vol. 267. - P. 2046-2056.
7. Wright G.D., Honrk J.F. // *J. Bacteriol.* - 1991. - Vol. 173. - № 3. - P. 1035-1040.
8. Nose H., Fushimi H., Seki A., et al // *J. Antibiot. (Tokio).* - 2002. - Vol. 55. - № 11. - P. 969-974.
9. Komissarova I.A., Nartsissov Y.R. // *Bull Exp Biol Med.* - 2001. - Vol.131. - № 4. - P. 330-332.
10. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи: Биология. Пути использования. -К.:Наукова думка. - 1991. - 328с.
11. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н. Методики по генетике дрожжей-сахаромицетов.-Л.:Наука. - 1976. - 95 с.
12. Seglen P.O. // *Meth. Cell Biol.* - 1976. - Vol. 13. - P. 29-33.
13. Woods R.A. // *J. Bacteriol.* - 1971. - Vol. 108. - P. 69-71.
14. Яхимович Р.И. Химия витаминов Д. -К.:Наукова думка. - 1978. - 248 с.
15. Андреищева Е.Н., Звягильская Р.А. // *Прикл. биохим. и микроб.* - 1999. - Т. 35. - № 3. - С. 23-256.
16. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М. и др. // *Микробиология.* - 2001. - Т. 70. - вып. 4. - С. 531-535.
17. Albertyn J., Hohmann S., Threvelin J.M., et al//*Mol. and Cell.Biol.*- 1994. - Vol.14.- №6.- P.4135-4144.
18. Аливердиева Д.А. // *Прикл. биохим. и микробиол.* - 2001. - Т. 37. - № 1. - С. 90-95.
19. Зеленский М.И. Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. -Л.:Наука. - 1986. - 140 с.
20. Miller G.I. // *Anal. Chem.* - 1959. - Vol. 31. - № 5. - P. 964-966.
21. Михайлова Н.П., Вьюнов К.А. // *Усп. соврем. биологии.* - 1984. - Т.104. - вып 1(4). - С. 89-104.
22. Вентуря Э.Ю., Саулите Л.А, Рапопорт А.И., и др. // *Микробиология.*- 1986.- Т.55. - в.1.- С.116-119.
23. Barton D.H., Corrie I.F., Bard M., et al // *J. Chem. Soc.* - 1974. - Vol. 1. - P. 1326-1333.
24. Физиологическая регуляция метаболизма дрожжей / Под ред. М.Ф. Залашко. -Мн.:Навука и тэхніка. - 1991. - 332 с.
25. Гальцова Р.Д. Стеринообразование у дрожжевых организмов. -М.:Наука. -1980. - 224 с.
26. Daum G., Lees N.D., Bard M., Dixon R. // *Yeast.* - 1998. - Vol. 14. - P. 1471-1510.
27. Stolz J., Sauer N. // *J. Biol. Chem.* - 1999. - Vol. 247. - № 26. - P. 18747-18752.
28. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. -М.:Наука. - 1982.- 56 с.
29. Hees-Peck A., Pichler H., Zanolari B., et al // *Mol. Biol. Cell.* - 2002. - Vol.13. - P. 2664-2680.
30. Andreasen A.A., Stier T.J.B. // *J. Cell Comp. Physiol.* - 1953. - Vol. 41. - P. 23-26.
31. Синицкая Н.А., Огородникова Т.Е., Михайлова Н.П. // *Прикл. биохим. и микробиол.* - 1993. - Т. 29. - вып. 5. - С. 675-684.
32. Робышева З.Н. // *Итоги науки: Сер. вирусология и микробиология.* - 1972. - Т.3. - С. 56-69.
33. Касумов А.Х. // *Усп. совр. биологии.* - 1977. - Т.83. - № 1. - С. 23-37.

## МОЖЛИВИЙ ВПЛИВ ФЕНОБАРБИТАЛУ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ТЕРАПІЇ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ

*І.С. Леонова, В.І. Падалко*

НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, Україна

## РЕЗЮМЕ

Досліджено, що фенобарбітал, істотно не впливаючи на морфологію, загибель клітин та інтенсивність дихання культури, може стимулювати накопичення ергостерину у клітинах культури, змінюючи таким чином їхню стрес-стійкість. Цей факт може свідкувати про те, що тривале використання лікарських засобів,

що містять фенobarбітал, при кандидозах та мікозах може впливати на ефективність препаратів, що використовуються.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** дріжджі, ергостерин, фенobarбітал.

## **POSSIBLE INFLUENCE of FENOBARBITAL ON EFFICIENCY OF THERAPY OF FUNGAL INFECTIONS**

*I.S. Leonova, V.I. Padalko*

Scientific research institute of biology of V.N.Karazin Kharkov National University, Ukraine

---

### **SUMMARY**

Fenobarbital was found out essentially not influencing morphology, death rate of cells and intensity of breath of cells culture. Fenobarbital can stimulate accumulation of ergosterol in cells of culture, changing their stress-stability. This fact can testify that long use of the preparations containing fenobarbital, at fungal infections can influence a course and treatment of diseases.

**KEY WORDS:** yeast, ergosterol, fenobarbital